

# 植物叶绿体转化的基因枪法研究进展

张彦桃 (内蒙古大学生命科学学院实验教学中心 呼和浩特 010021)

**摘要** 叶绿体基因组转化由于具有独特的优越性,逐渐成为植物基因工程研究的热点,而基因枪转化法是目前较为成熟的叶绿体基因转化技术。本文简述了基因枪转化的原理、方法及优缺点,并重点阐述了叶绿体转化的优点及实践应用的研究进展。

**关键词** 植物 基因枪 叶绿体 转化

高等植物叶绿体基因工程是植物基因工程发展的新领域。1988年 Boynton 等<sup>[1]</sup>人以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为材料,用基因枪成功进行了外源基因对叶绿体的转化。其后 Svab 等<sup>[2]</sup>将此技术成功用于高等植物。目前为止已有多种植物,如烟草、马铃薯、油菜等,实现了叶绿体基因转化。近年来叶绿体基因转化技术的进步,更加显示出其巨大的应用前景。研究证实它是一个能散状辐射到农艺性状改良以及用植物生物反应器生产各种药物、疫苗抗体、功能食品及工业、环保产品的通用核心技术<sup>[3]</sup>。

叶绿体转基因技术与传统的核基因转化相比,有以下几个突出的优点:①叶绿体属于母性遗传可以防止外源基因随花粉发生逃逸而污染环境,解决了生物学家一直担心的转基因植物安全性问题。②叶绿体基因组倍性高,例如一个烟草叶片细胞就有约100个叶绿体颗粒,每个颗粒又有100多个叶绿体基因组,所以其拷贝数极高,这就造就了外源基因的高表达。③叶绿体基因转化可以通过同源重组等手段实现定点整合,克服了核基因转化的不可预测性,从而也克服了“基因沉默”现象。④由于大多数叶绿体基因是以多顺反子为转录单位,产生多顺反子 mRNA 来合成蛋白质,所以由一个启动子引导下的多个外源基因可以同时也在叶绿体中表达,可实现多个基因的同时表达。

近年来,各国科学家大量尝试叶绿体基因转化方法方面的工作,这些工作借鉴核基因转化,主要有以下四种:①花粉管导入法。如刘博林等<sup>[4]</sup>将含有龙葵 *atrazine* 基因 *psbA* 的质粒 pBR322 转化大豆,获得了抗 *atrazine* 的大豆植株。经分子检测证实, pBR322 质粒 DNA 整合到大豆叶绿体基因组。②PEG 介导法。该方法属原质体转化方法。Wendy C<sup>[5]</sup>等用 PEG 法将脂

肪酸脱氢酶基因转化番茄叶绿体基因组,获得的转化株和对照植株比较,叶和种子中不饱和脂肪酸程度均提高,不但提高了番茄的耐寒性,同时也提高了其营养价值。③农杆菌介导法。在核基因转化中被证实是非常有效的方法,尤其用于单子叶植物时明显优于其他转化方法。在叶绿体转化中也有人尝试,但未得到很好的转化结果,其有效性还有待于进一步探讨。④其他方法。在原有的核基因转化技术的基础上,针对叶绿体基因组转化的特点,Knoblauch 等<sup>[6]</sup>研究开发了一种“毫微注射技术 (femtojection technique)”的叶绿体基因组转化方法。这种技术由于用特殊的合金做注射器,大大减少了注射器对叶绿体造成的伤害。他们用携带 *bla* 基因的质粒转化蓝细菌 (*Phormidium laminosum*),结果转化株对氨苄青霉素有抗性。一种转运肽介导的叶绿体间接转化方法是在构建植物表达载体时,把目的基因和叶绿体的转运肽编码序列相连,然后用细胞核转化技术把外源基因导入植物细胞,使目的基因编码的蛋白质有可能在转运肽的引导下输送到叶绿体颗粒中去<sup>[7]</sup>。这种方法利用已经很成熟的核基因转化方法,克服了叶绿体基因组转化的多拷贝问题,也是一种可以进一步探索的叶绿体基因组转化方法。但目前比较成熟的叶绿体基因转化方法是基因枪转化法。

## 1 叶绿体基因枪法转化技术的发展

基因枪法由美国康乃尔大学 Sanford 提出,又称为粒子轰击技术,原理是在一定的压力作用下,外源 DNA 被金属微粒吸附在其表面,被带入受体细胞中,并随机整合到受体基因组中。基因枪法转化的优点是不受基因型限制,适用于不同作物及同一物种的不同品种。该方法的另一大优点就是可以转化线粒体、叶

[12] 高嘉卉,南志标. 2007 禾草内生真菌生物碱的研究进展. 生态学报, 7(6): 2531~2546

[13] 陈丽梅,樊妙姬,李玲. 2000 甘蔗固氮内生菌重氮营养醋杆菌的研究进展. 微生物学通报, 27(1): 63~66

[14] 赵记军,徐培智,解开治,等. 2008 内生固氮菌在水稻上的应用效果研究初报. 广东农业科学, (1): 35~38

[15] Stanford TM L, Stanford NR, Coelho LCBB et al. 2002 Production and characterization of a thermostable glucanase from *Streptomyces* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology* 83(2): 105~109

*Streptomyces* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology* 83(2): 105~109

[16] 杨水英,李振轮,青玲,等. 2007 产几丁质酶烟草内生细菌的筛选及产酶条件研究. 西北农业学报, 16(4): 223~227

[17] 卢定强,陈均. 2001 银杏内脂的药理作用. 江苏理工大学学报, 22(2): 5~8

[18] 严铸云,罗静,郭晓恒,等. 2007 产银杏内酯内生真菌的筛选及培养条件研究. 天然产物研究与开发, 19(4): 554~558

绿体等植物的不同细胞器。在核基因转化过程中,和其他技术相比,基因枪转化法也呈现出一些不可避免的缺点:如基因插入是多拷贝的,往往会出现目的基因失活或基因沉默现象;轰击过程中往往造成基因片段的断裂,并常常会出现非转化体和嵌合体等。叶绿体基因枪转化首先由 Boynton 等于 1988 年应用于莱茵衣藻。1990 年 Svab 等用烟草叶片作为轰击对象,以突变型 16S rDNA 作为筛选标记基因,获得了稳定的壮观霉素抗性转化体。之后叶绿体基因转化成功的例子大多由基因枪法转化实现。

## 2 叶绿体基因枪法转化的影响因素

叶绿体基因枪转化体系的优化直接关系到转化的成败,并且由于叶绿体转化需要外源 DNA 叶绿体双层膜,所以其转化效率远远低于核基因转化。借鉴核基因枪转化的经验,该技术主要影响因素有受体种类、受体状态、轰击距离及轰击次数等。

目前用于叶绿体基因枪转化的受体主要有:①叶片。一般是约 3cm 的无菌叶片。主要做法有直接用野生无菌苗叶片,如邹竹荣等<sup>[8]</sup>尝试的烟草叶绿体基因枪转化;也有用茎节繁殖的无菌苗叶片,如任延国<sup>[9]</sup>等建立的烟草叶绿体基因枪转化体系,以及顾海燕等<sup>[10]</sup>用于枸杞叶绿体基因枪转化体系。②叶柄。将种子萌发后 4~5 天的子叶叶柄作为轰击对象,如侯丙凯等<sup>[11]</sup>以叶柄为受体材料将抗虫基因定点整合到油菜叶绿体中。③胚性愈伤组织。如 Dufourmantel 等<sup>[12]</sup>用 FNL 培养基培养的大豆胚性愈伤组织,选取绿色致密的作为轰击对象,得到了可育的大豆叶绿体转基因植株。

叶绿体基因枪转化和核基因转化有共同的操作要求,即在轰击前、后一般将受体作高渗处理使其处于最佳状态,轰击距离一般以 9cm 为宜,连续轰击 2 次,既有利于增加转化效率,又不会造成金粉对叶绿体颗粒的破坏。

## 3 叶绿体基因枪转化的应用

3.1 植物性状改良方面 近年来由于多种植物叶绿体基因组测序工作的完成,各国科学家不断把叶绿体基因转化应用到作物性状改良,在对模式植物烟草进行大量工作后,开始转向普通的作物,如油菜、大豆、番茄等。

在抗虫作物的培育方面,侯丙凯等<sup>[11]</sup>采用带有叶绿体 *rps7*(核糖体蛋白小亚基基因)和 *ndhB*(NADH 脱氢酶亚基 B 基因)两个基因的 pNRAB 为载体,抗虫基因 *cryIaA10*(苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因)插入这两个同源片段之间转化油菜叶绿体,实现了抗虫基因的定点转化。幼虫饲喂试验表明,所获得的油菜叶

绿体转基因植株具有杀虫和抑制幼虫生长的特性。同时,此试验也开拓了对未测序的植物进行叶绿体基因组转化的先河,拓宽了基因枪法转化植物叶绿体,进行作物遗传改良的范围。苏宁等<sup>[13]</sup>将水稻疏基蛋白酶抑制(OC)基因和 Bt 基因分别克隆在含有同源片段的载体上,用基因枪法共转化烟草叶片,得到转基因双价抗虫烟草。不同作用机理的抗虫基因的共转化,可以发挥堆塔效应(pyramiding effect),避免或延缓害虫产生抗性。

在抗菌作物的培育方面 DeGray 等<sup>[14]</sup>将抗菌肽基因 MSI~99 转化烟草叶绿体基因组,转基因植株 T1、T2 代的 MSI~99 均高水平表达,分别达到 88% 和 96%。体外分析结果表明,T2 代烟草叶提取物可抑制 96% 细菌性疫病菌的生长,T1 代烟草叶提取物能阻碍三种真菌孢子(*Aspergillus flavus* *Fusarium moniliforme* and *Verticillium dahliae*)的萌发。植物体内实验接种病原物烟草野火病菌对照叶片有明显坏死斑,而转化叶片没有产生坏死现象。

在抗非生物逆境胁迫作物的培育方面,目前已做的工作有培育抗除草剂及耐盐植物等的叶绿体基因工程。如 Heifetz 等<sup>[15]</sup>将合成的胡萝卜素生物合成抑制剂(protoporphyrinogen IX oxidase inhibitor)基因导入叶绿体基因组,转化烟草对乙氧氟草醚的抗性大大提高。Zhag 等<sup>[16]</sup>用基因枪将胆碱单加氧酶基因转化烟草叶绿体基因组,可以使烟草细胞大量积累甘氨酸甜菜碱,从而提高其耐盐性。某些金属离子如汞,特别是有机汞是影响植物、动物及人的高毒性物质,在植物中它们最先入侵的就是叶绿体,抑制电子传递和光合作用。叶绿体基因工程可以增强植物耐受生物污染的能力。如 Oscar 等<sup>[17]</sup>将含有编码汞离子还原酶的 *merA* 基因和编码有机汞裂解酶的 *merB* 基因的 MerAB 转化烟草叶绿体基因组,苯汞基醋酸盐(PMA)实验表明转化子在含有 400 $\mu$ mol/L PMA 的土壤中的植物干重的大于对照组在 100、200、400 $\mu$ mol/L PMA 的土壤中的干重。此法还可以推广到植物对其他金属的耐受实验中,从而增加植物的光合量,提高作物产量。

3.2 生物反应器的培育 由于外源基因在叶绿体中具有高效表达的潜力,从而可将叶绿体作为生物反应器加以利用,实现疫苗食品化。也可以用以提高日常食物中人类必须的氨基酸、脂肪、糖类等的含量,增加其营养价值。目前作为生物反应器研究较多的有衣藻和烟草等模式植物,在其他植物也做了一些尝试。

衣藻作为单细胞真核生物,由于具有结构简单、序列结构清楚了利于遗传操作,培养条件简单,可以大规模培养等优点,素有“绿色酵母”之称。Boynton 等人用

基因枪以莱茵衣藻首次实现叶绿体外源基因的遗传转化。耐高温 $\alpha$ -淀粉酶是一种重要的工业酒精生产用酶。杨宗岐等<sup>[18]</sup>构建来源于嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因的叶绿体表达载体 p64A, 然后用基因枪法转化衣藻, 含有衣藻叶绿体基因组同源片段和壮观霉素抗性基因的 p64A 高效表达。实验结果证明, 在植物叶绿体中表达工业酶制剂是可行的。Meng等<sup>[19]</sup>将构建的融合口蹄疫病毒 FMDV 的 VP1 基因和霍乱毒素 B 亚基基因的绿藻叶绿体转化载体 pACTBVP1 基因枪法转化绿藻, 检测结果表明, CTB-VP1 融合蛋白表达量占叶绿体可溶性蛋白总量的 3%, 进一步证实了叶绿体转化植物可以作为培育植物口服疫苗的新途径。顾海燕等<sup>[10]</sup>将抗肝炎病毒基因 H<sub>1</sub>E 基因枪法转化枸杞, 初步证明外源抗肝炎病毒基因已经整合到枸杞叶绿体中, 为培育特殊用途的保健食品提供了新的思路。Hirosuke K 等<sup>[20]</sup>将壮观霉素抗性基因 *acdA* 和绿色荧光蛋白基因 GFP 构建于莴苣叶绿体基因 *rbcl* 和 *accD* 之间, 基因枪法转化莴苣 (*Lactuca sativa* L.), 结果表明转化莴苣叶绿体表达 GFP 的量可达到叶绿体可溶性蛋白的 36%, 并且所有 T<sub>0</sub> 代均可育, T<sub>1</sub> 代表现稳定。实验转化叶用蔬菜叶绿体的成功, 为利用植物生产可食用疫苗、抗体、药物提供了新的途径。

综上所述, 基因枪法转化植物叶绿体基因组研究在国内外都有长足的发展, 不论是在模式植物还是在叶绿体基因序列不清楚的其他植物中都有尝试, 但目前叶绿体基因工程的关键还是同质化问题。由于高等植物细胞中叶绿体基因拷贝数高, 基因枪轰击后获得的 T<sub>1</sub> 代通常是异质的, 即同一细胞中同时含有转化和未转化的叶绿体基因组。在后代的分离过程中如果外源基因通过重组不能达到完全同质化, 则造成外源基因丢失而导致转基因失败。针对这一问题有人采用叶绿体 16S rRNA 启动子, 它在核基因组中不能使 *acdA* 表达, 从而用抗生素高选择压进行筛选达到同质化。崔杰等<sup>[21]</sup>在甜菜叶绿体转化研究中采用高浓度的 PPT 做筛选剂, 并通过多次继代筛选和二次分化与多次继代筛选相结合的方法来提高同质化程度, PCR 结果表明, 转化体的同质化程度随分化、继代次数增加而提高。在此研究中在 2 轮筛选 6 次继代的转化植株中已经看不到野生型条带, 初步表明转化体已达到完全同质化。

#### 主要参考文献

- [1] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH et al. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojection. *Science* 240 (4858): 1534 ~ 1538
- [2] Svob Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. 1990. Stable transformation of

plastids in higher plants. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 87 (21): 8526 ~ 8530

- [3] 王旭静, 贾士荣. 2008. 国内外转基因作物产业化的比较. *生物工程学报*, 24(4): 541 ~ 546
- [4] 刘博林, 岳绍先, 胡乃璧, 等. 1989. 龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达. *中国科学 B 辑*, 19 (7): 699 ~ 706
- [5] Wendy C, Paolo L, Nunzia S et al. 2008. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Research* 17 (5): 769 ~ 782
- [6] Knöblach M, Julian M H, John C G et al. 1999. A galinstan expansion lentiviral microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nature Biotechnology* 17 (9): 906 ~ 909
- [7] 马三梅, 王永飞. 2004. 高等植物叶绿体基因组的转化. *植物生理通讯*, 40(3): 385 ~ 390
- [8] 邹竹荣, 张中林, 山松, 等. 1998. 烟草叶绿体转化载体的构建及转基因植株的获得. *作物学报*, 22(4): 410 ~ 415
- [9] 任延国, 邹竹荣, 张中林, 等. 1997. 基因枪微弹轰击烟草叶绿体遗传转化体系的建立. *农业生物技术学报*, 5(1): 47 ~ 53
- [10] 顾海燕, 马昕, 王仙琴, 等. 2007. 抗肝炎转基因枸杞新品种培育的初步研究. *陕西农业科学*, (6): 44 ~ 49
- [11] 侯丙凯, 胡赞民, 党本元, 等. 2002. 定点整合抗虫基因到油菜叶绿体基因组并获得转基因植株. *植物生理与分子生物学学报*, 28(3): 187 ~ 192
- [12] Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F et al. 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology* 55 (4): 479 ~ 489
- [13] 苏宁, 杨波, 孟昆, 等. 2002. 双价抗虫基因共转化烟草叶绿体的研究. *中国农业科学*, 35(4): 394 ~ 398
- [14] DeGray G, Rajasekaran K, Smith F et al. 2001. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology* 127 (3): 852 ~ 862
- [15] Heifetz B P. 2000. Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82 (6 ~ 7): 655 ~ 666
- [16] Zhang J, Tan W, Yang X H et al. 2008. Plastid-expressed choline monoxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Report* 27(6): 1113 ~ 1124
- [17] Oscar N R, Hussein S H, Norman T et al. 2003. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiology* 132(3): 1344 ~ 1352
- [18] 杨宗岐, 李轶女, 张志芳, 等. 2006. 来源于 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因在衣藻叶绿体中的表达. *生物工程学报*, 22(4): 545 ~ 549
- [19] Meng S, Kai X Q, Ning S et al. 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 25 (3): 1087 ~ 1092
- [20] Hirosuke K, Atsushi Y, Hiroshi A et al. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv Ciso (lettuce) plastids. *Transgenic Research* 15(2): 205 ~ 217

# 植物源农药

徐芬芬 叶利民 王爱斌 李 朋 (江西省上饶师范学院生命科学系 334001)

摘 要 本文概述了植物源农药特点、应用研究现状及展望。

关键词 植物源农药 现状 展望

## 1 植物源农药简介

长期使用化学农药带来了种种弊端,如有害生物抗药性的产生、残留毒性以及环境污染等。目前,许多高毒性、高残留、持久性农药已被禁用。理想的农药应该对有害生物高效、对非靶标生物安全、农药本身易分解且分解产物对环境无害。植物是生物活性化合物的天然宝库,据估计,植物产生的次生代谢产物超过 40 万种,这些代谢产物中的萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特的氨基酸和多糖等均具有杀虫或抗菌活性。从植物中探寻新的活性先导物或新的作用靶标,通过类推合成或生物合理设计进行新农药的开发已成为当前农药化学和农药毒理研究的热点<sup>[1]</sup>。植物源农药是以植物的具有杀虫、杀菌、除草及植物生长调节等活性的某些部分经加工而成的药剂<sup>[1-3]</sup>。植物源农药根据作用对象不同分为 3 类:植物源杀虫剂、植物源杀菌剂及植物源除草剂。植物源农药按其有效活性成分及用途一般可分为:生物碱类、萜烯类、萜醌和类黄酮类、精油类、光活化毒素类及甾体类等。

## 2 植物源农药的优缺点

2.1 优点 植物源农药是生物农药最大的一类,与化学农药相比有许多优点:

(1)植物源农药的有效成分为天然物质,自然界有其降解途径,对环境的污染较小<sup>[4]</sup>,因而被称为绿色农药。

(2)植物性杀虫剂对害虫的作用机理与一般农药差别很大,一般农药只作用于害虫某一生理系统的一个或少数几个靶标,而多数植物性杀虫剂,由于活性复杂,能够作用于害虫的多个器官系统,作用方式独特,有利于克服害虫抗药性<sup>[2]</sup>。

(3)有些植物性农药可刺激植物生长。

(4)有的可以因地制宜取材加工生产,提高农林产业效益。

(5)产品开发潜力大。地球上的植物种类多,分布广,已识别的就有 50 万种之多,且目前植物源农药还处于基础研究阶段,即使是已开发出的品种也不完

全成熟,其毒理性质尚不完全清楚,加工制剂单一<sup>[2,3]</sup>。

(6)一般具有对毒杀对象选择性强,对人、畜及天敌毒性低,开发和生产成本相对较低的特点,不会破坏自然生态的防御系统<sup>[4]</sup>。

2.2 缺点 尽管植物源杀虫剂有诸多的优点,但也有其自身的弱点:

(1)除了除虫菊酯少数品种外,大多数药性缓慢,喷药次数多,残效期短,“性急”农民不易接受<sup>[7]</sup>。这是生物源农药的主要局限性。

(2)活性成分易分解,制剂成分复杂,不易标准化。但随着科学的发展,这些缺点正在得到解决<sup>[7]</sup>。

(3)植物性毒素只有在光照条件下才有作用,但其光活性过程也是其降解过程,这使其毒性持续期短<sup>[4]</sup>。因此,已有专家建议将植物源农药与化学农药或生物农药结合在一起使用,相互补充达到最佳防治效果。

(4)由于植物的分布存在地域性,在加工场地的选择上受到的限制因素多;植物的采集有季节性等<sup>[7]</sup>。

植物源农药一般为水剂,受阳光或微生物的作用后易分解,半衰期短,残留降解快,被动物取食后富集机制差。这些特点使植物源农药的大量使用不会产生药害,对环境的污染也会相对减少,可以成为真正的无公害农药。同时,植物源农药对作物还有营养作用,可提高农产品的价值。

## 3 植物源农药的应用现状与展望

3.1 应用现状 目前我国有关植物源农药的研究内容涉及楝科、卫矛科及菊科等科属的多种植物,已有烟碱、苦参碱、楝素、茴蒿和茶皂素等 20 多种植物源农药登记注册,生产厂家达 112 家。当前,我国共有 20 个植物源农药单剂登记,包括血根碱,丁子香酚,苦参碱,苦皮藤素,楝素,藜芦碱等<sup>[1-3]</sup>。加工剂型以乳油及水剂为主,还有可溶性液剂、水乳剂、微乳剂及可湿性粉剂等,防治对象包括蔬菜、果树、茶叶及棉花等经济作物病虫害<sup>[1,3]</sup>。

我国植物源农药大多以复配剂的形式出现,包括植物源农药之间的混配及植物源农药与化学农药或生

[21] 崔 杰,李滨胜,杨 谦,等. 2008 甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 叶绿体转化体系建立及抗虫和抗除草剂植株的获得. 生物化学与生物物理进展, 35(12): 1437 ~ 1443